基于免疫组织化学方法的中华蜜蜂蕈形体胚后发育过程中细胞增殖和凋亡的观察

李兆英[1,2,*]，奚耕思[2]

(1. 陕西教育学院生物科学与技术系，西安 710061；2. 陕西师范大学生命科学学院，西安 710062)

摘要：蕈形体是昆虫学习和其他复杂行为的整合中心。本研究通过形态解剖、BrdU 免疫组织化学和原位末端转移酶标记(TUNEL)细胞凋亡检测等技术，对中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 蕈形体胚后发育过程中细胞的增殖和凋亡模式进行了比较研究。结果表明：中华蜜蜂的蕈形体起源自幼虫早期脑背侧的几个大型的成神经细胞，它们通过不对称的细胞分裂产生成神经细胞，随后这些细胞经过多次对称分裂形成中增殖细胞群和侧增殖细胞群，最终生成了所有的 Kenyon 细胞。蕈形体的蕈体柄出现在 3 龄幼虫；蕈体冠体积的迅速增加发生在蛹期。蕈形体发育过程中，细胞凋亡主要集中在蛹发育期的 3 - 6 d 内，细胞凋亡的开始和细胞增殖的终止在时间和空间上非常一致。本研究为蜜蜂学习记忆等行为学研究提供了理论依据。

关键词：中华蜜蜂；蕈形体；胚后发育；增殖；凋亡；5-溴脱氧尿嘧啶核苷；原位末端转移酶标记

中图分类号：Q965　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2011)06-0657-07

Observation of neurogenesis and programmed cell death in the mushroom bodies of the honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae), using immunohistochemistry method

LI Zhao-Ying[1,2,*], XI Geng-Si[2] (1. Department of Biological Science and Technology, Shaanxi Institute of Education, Xi'an 710061, China; 2. College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: Mushroom bodies (MBs) are insect brain centers involved in learning and other complex behaviors. The proliferation and programmed cell death (PCD) pattern of MBs in the honeybee, *Apis cerana cerana*, was comparatively studied by using 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) incorporation and the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) technique. The results showed that the MBs are created in their entirety by several neuroblasts per hemisphere. Asymmetric divisions produce a smaller ganglion mother cell (GMC) and regenerate the neuroblast. Kenyon cells in a proliferation cluster are formed through symmetrical division of MB neuroblasts. These neuroblasts divide continuously from early embryogenesis until the late pupal stage. Peduncular neuropil was first visible in the 3rd instar. The calycal neuropil rapidly increased in size during the pupal stage. Extensive apoptosis in the MBs could be detected only within a narrow time window from day 3 to day 6 of the pupal stage during metamorphosis. Extensive apoptosis in the MB proliferative clusters started at about the time when proliferation began to cease. This study provides a theoretical basis for behavioural research.

Key words: *Apis cerana cerana*; mushroom body; postembryonic development; proliferation; apoptosis; BrdU; TUNEL

蕈形体(mushroom bodies, MBs)是昆虫脑中重要的感觉整合中心，它在昆虫的嗅觉辨别、求偶调节、空间定位学习以及昆虫的觅食行为、进攻行为等方面都扮演着重要的角色(Hammer and Menzel, 1995; Heisenberg, 1998)。在昆虫神经系统的发育过程中，神经干细胞一般具有两种分裂方式：对称分裂

基金项目：陕西省科技计划项目(2008K02211)

作者简介：李兆英，女，山东青州人，1971 年生，博士研究生，副教授，研究方向为昆虫生理及发育

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: apis2002@yahoo.com.cn

收稿日期 Received: 2010-10-11；接受日期 Accepted: 2011-03-10

(symmetrical division)和不对称分裂(asymmetric division)(Nordlander and Edwards, 1969),对称分裂可维持干细胞的数量,而不对称分裂则是细胞多样性形成的基础。这样的分裂方式在昆虫中枢神经系统,如在蕈形体、视叶和嗅叶的发育过程中非常普遍。

关于昆虫蕈形体发育过程中细胞的增殖和凋亡的模式,国内外学者进行过一些研究。Ceron 等(2006)对黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的研究显示,蕈形体最初是由 4 个成神经细胞形成的,而且蕈形体神经发生的时间比中枢神经系统的其他部分要长。在膜翅目的社会性昆虫中,蕈形体的体积和结构较其他种类更为复杂,并且具有更高的可塑性,这同社会性昆虫复杂的行为具有十分明显的相关性(Heisenberg, 1998)。此外,对 *Achaeta domesticus*(Cayre *et al.*, 1996)、佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus*(Gronenberg *et al.*, 1996)、帝王蛱蝶 *Danaus plexippus*(Nordlander and Edwards, 1969)等蕈形体发育的比较研究也都表明昆虫在变态期间蕈形体的组织结构进行了广泛的重组。

广泛的细胞凋亡是动物中枢神经系统发育过程中的一个典型特征。在神经系统形成之初,超量的神经元首先出现,然后通过一个选择的机制,多余的神经细胞因被淘汰而凋亡,使适当规模和结构的神经网络建立和确定(Ganeshina *et al.*, 2000;李兆英, 2010)。Ganeshina 等(2000)对意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 变态发育期间蕈形体中细胞凋亡的模式进行了研究;Nordlander 和 Edwards(1969)、Booker 和 Truman(1987)分别对帝王蛱蝶 *D. plexippus* 和烟草天蛾 *Manduca sexta* 脑发育过程中成神经细胞的凋亡进行了研究。

本研究通过形态解剖、BrdU 免疫组织化学(5-bromo-2-deoxyuridine incorporation)以及原位末端转移酶标记(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling, TUNEL)细胞凋亡检测等技术,对中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 蕈形体胚后发育过程中细胞的增殖和凋亡的模式进行了研究,为蜜蜂胚后发育过程中脑的基因表达研究提供野生型参考,也为昆虫中枢神经系统发育模式的研究提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试虫

实验所用的中华蜜蜂均购自西安大峪中华蜜蜂养殖基地。所取材料均来自同一蜂群。幼虫(larva, L)共 5 龄(L1 – L5),根据戴氏定律(Dyar's law)(Dyar, 1890),每一头幼虫的龄期通过测量头壳的宽度来决定;预蛹(prepupa, PP)期 2 d;蛹(pupa, P)期约 9 d(P1 – P9)。

1.2 BrdU 掺入处理

使用 3 种 BrdU 处理方法联合处理中华蜜蜂幼虫和蛹的活体:(1)饲喂法,对于 1 – 4 龄幼虫,用浓度为 25 mg/mL 的 BrdU 混合溶液(H_2O 和蜂王浆以 1∶1 比例混合)进行饲喂(Edwards, 1969)。(2)直接注射法,对于 5 龄幼虫、预蛹和蛹,分别从其触角下方直接注射约 3 μL 浓度为 25 mg/mL 的 BrdU(B9002, Sigma)。(3)BrdU 体表接触法,浓度为 70 mg/mL 的丙酮溶液和 25 mg/mL 的 BrdU 以 1∶3 混合(Winberg *et al.*, 1992),点滴在幼虫和蛹的中央单眼下方。

1.3 BrdU 免疫组织化学染色

将 BrdU 处理过的 1 – 5 龄幼虫,预蛹及 1 – 8 d 蛹各 3 ~ 5 头,取头部,4% 多聚甲醛 4℃ 固定 8 h。70%, 80%, 90%, 95% 和 100% 梯度酒精脱水,石蜡包埋,横向连续切片,厚度为 7 μm。切片裱于涂有多聚赖氨酸的载玻片上,烘干备用。

切片用二甲苯脱蜡,入梯度酒精复水;于 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液中,微波炉中抗原修复 18 min;PBS 洗 3 次;3% 过氧化氢封闭内源性酶 10 min,TBS 洗 3 次;滴加正常山羊血清封闭液,37℃ 30 min;滴加小鼠 BrdU 单克隆抗体(1/200)(ab8039, ABCAM),湿盒中 4℃ 孵育过夜,PBS 洗 3 次。滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG,37℃ 120 min,PBS 洗 3 次;滴加过氧化物酶 37℃ 孵育 30 min,PBS 洗 3 次;DAB 显色后镜检,中性树胶封片,Nikon 数码显微成像系统(DS-5M)拍照。阴性对照以 PBS 代替一抗。

1.4 TUNEL 细胞凋亡检测

切片用二甲苯脱蜡,入梯度酒精复水;复合消化液(蛋白酶 K-胃蛋白酶)37℃ 孵育 20 min,PBS 洗 2 次;滴加新鲜配置的 TUNEL 反应混合溶液(Roche),湿盒中 37℃ 孵育 60 min,PBS 洗 3 次;滴加转化剂-POD,37℃ 孵育 30 min,PBS 洗 3 次;DAB 显色后镜检,中性树胶封片,Nikon 数码显微成像系统(DS-5M)拍照。

阴性对照以不含末端脱氧核糖核酸转移酶的核苷酸混合液代替 TUNEL 反应混合溶液。

1.5　细胞计数

为了评价蕈形体发育过程中细胞的增殖和凋亡情况，对切片上 BrdU 标记的增殖细胞（8 h 掺入）和 TUNEL 标记的凋亡细胞的数量进行计数（7 μm 切片）。计数的范围包括幼虫和蛹发育的各个阶段。通常切片上标记的细胞核的数量同细胞的数量是成比例的，比例系数依赖于切片的厚度，细胞的大小、形状以及核的方位。校正公式为 $C = c[t/(t+d)]$，C 是校正数，c 为常数，t 为切片厚度，d 是细胞的直径（Abercrombie，1946）。每一时间点计数 1～3 头蜜蜂的 1～6 个蕈体冠，计算其平均数，误差值为标准误（*SE*）。

2　结果与分析

在中华蜜蜂 1 龄幼虫（L1）前脑的前端，BrdU 标记显示左脑半球的几个成神经细胞已开始分裂增殖（图版Ⅰ：A）。到 2 龄幼虫（L2），每个脑半球背侧的两个增殖细胞丛变得很明显，它们排列紧密并有大量的细胞核被 BrdU 所标记。在前脑的背部边缘，能看到了几个大型的成神经细胞（10 ± 1 μm），它们明显地同增殖细胞丛分隔开，在它们的下边常常有两个 BrdU 标记的大小、形态很相似的小细胞（图版Ⅰ：B）。在 3 龄幼虫（L3），BrdU 标记显示两个成神经细胞丛中都有大量的成神经细胞处于旺盛的分裂阶段，每一丛成神经细胞开始发出蕈体柄伸入前脑神经纤维网（图版Ⅰ：C）。中间成神经细胞丛的细胞数量略多于侧面（图 1）。4 龄幼虫（L4），增殖细胞丛的细胞数量进一步增加，蕈体柄进一步加粗，边界上被标记的神经胶质细胞明显可见（图版Ⅰ：D）。到了 5 龄幼虫（L5），Kenyon 细胞的数量大大增加，大小、形态一致的 Kenyon 细胞群环绕着每一个成神经细胞丛。蕈形体的柄区和神经纤维网比前期明显增大（图版Ⅰ：E）。

在预蛹（PP）和蛹（P）早期，Kenyon 细胞快速增殖，每一个成神经细胞丛的细胞数量在这个阶段达到顶峰（图 1）。BrdU 标记的神经节母细胞存在于每一丛细胞的中央，新形成的 Kenyon 细胞中外部致密细胞和内部非致密细胞可明显区分。α 叶和 β 叶非常显著地伸向前脑的中央（图版Ⅰ：F）。蛹发育的第 2 天（P2），增殖细胞群的形状有所改变，更趋于圆锥形或圆柱形（图版Ⅰ：G），增殖细胞的数量有所减少（图 1）。在蛹发育的第 3 天（P3），细胞增殖活跃，被 BrdU 标记的增殖细胞均匀地遍布于整个细胞丛（图版Ⅱ：A）；而此时，凋亡细胞也开始出现，它们主要位于增殖细胞群的顶端边缘（图版Ⅱ：B）。到蛹发育的第 4 天（P4），蕈形体的形态已接近成虫，领、唇区和基环已基本形成；中、侧蕈体冠中 BrdU 标记的增殖细胞明显减少（图版Ⅰ：H）。蛹期第 5 天（P5），中蕈体冠中的增殖细胞已基本消失，侧蕈体冠中 BrdU 标记增殖细胞群也已收缩到蕈体冠中下部的很小的区域，被顶端和侧面的内部非致密细胞所环绕（图版Ⅰ：I；图版Ⅱ：C）；凋亡细胞呈三角状堆积在逐渐消失的增殖细胞丛的区域（图版Ⅱ：D）。在蛹发育的第 6 天（P6），增殖细胞的数量已非常少（图版Ⅱ：E），而凋亡细胞的数量进一步增加，几乎遍布了整个增殖细胞区（图版Ⅱ：F）（图 1）。

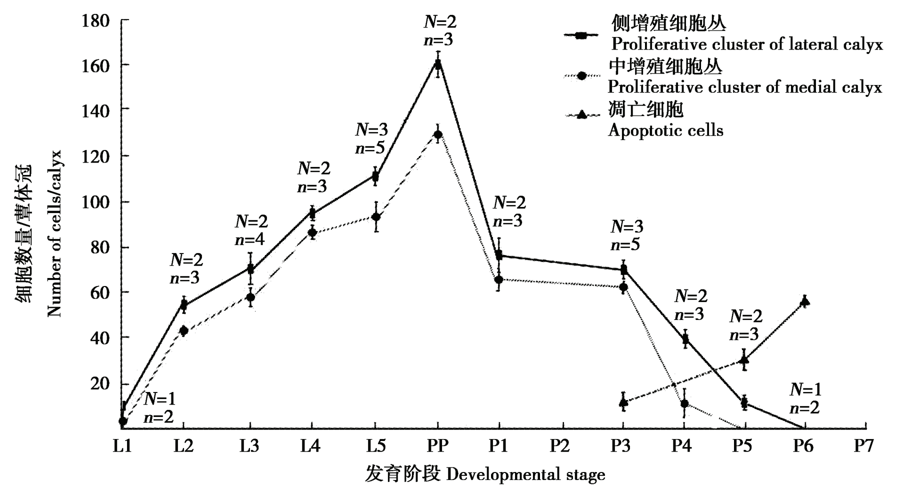


图 1　中华蜜蜂蕈形体发育过程中增殖细胞和凋亡细胞数量变化图

Fig. 1　Number of proliferation and programmed cell death in the mushroom bodies of *Apis cerana cerana*

N 和 *n* 分别表示昆虫数量和细胞群数量。*N* and *n* denote the number of insects and the number of optic lobes, respectively. L1 – L5：分别表示 1 – 5 龄幼虫 1st – 5th instar larva, respectively; PP：预蛹 Prepupa; P1 – P7：分别表示 1 – 7 日龄蛹 Day 1 to day 7 pupa, respectively.

3 讨论

3.1 蕈形体发育过程中细胞的增殖模式

在昆虫神经系统的发育过程中的 2 种细胞增殖方式在蕈形体的发育过程中都能够看到。通过组织学染色和 BrdU 掺入技术的研究显示，在蜜蜂幼虫蕈形体发育早期，每一个增殖细胞丛的旁边和上端都有几个大型的成神经细胞。由于干细胞分裂周期较长，且大多数处于 G_0 期，所以一般很难通过 BrdU 的方法标记到分裂中的细胞。这些大型的成神经细胞存在的时间较短，它们通过不对称的细胞分裂方式复制自身，并产生小的成神经细胞，这些成神经细胞在很短的时间内，通过对称分裂的方式快速增殖，形成增殖细胞群。当成神经细胞达到一定数量时，既分裂生成神经节母细胞并最终生成所有的 Kenyon 细胞。这两种典型的神经细胞增殖方式在中华蜜蜂视叶的发育过程中同样能够看到(李兆英和奚耕思，2010)。在成年蜜蜂，脑部的神经细胞一般不会再分裂增殖。而黑腹果蝇 *D. melanogaster* 蕈形体的成神经细胞从幼虫发育早期一直到变态发育结束，都进行的是不对称的细胞分裂(Ceron *et al.*，2006)。这同帝王蛱蝶 *D. plexippus* 非常相似(Nordlander and Edwards，1969)。对蕈形体和视叶发育过程的观察都证实，对称的细胞分裂主要发生在短时间内形成大量神经细胞的阶段。

3.2 蕈形体发育过程中细胞增殖和凋亡的关系

从功能的角度来看，细胞的增殖与凋亡是两个截然相反的生物学现象。然而，近年来，随着人们对这两个过程研究的深入，越来越多的证据表明这两个过程实际上有着非常密切的联系。大量的实验观察显示，在动物体内，细胞凋亡几乎毫无例外地发生在增殖活跃的组织。在这些组织中，细胞的增殖和凋亡处在一种动态的平衡中(蔡文琴和李海标，1999)。

对中华蜜蜂蕈形体神经发生过程的研究表明，细胞增殖从幼虫孵化之初直到蛹第 5 天都非常活跃，而在蛹发育第 4 天期前后，其他脑部结构成神经细胞的增殖活动基本都已经终止。这种强烈、持续的细胞增殖是形成成年蜜蜂约 340 000 个 Kenyon 细胞的基础，而这个数字远远超过其他昆虫种类(Fahrbach *et al.*，1998)。使用连续石蜡切片进行的 BrdU 和 TUNEL 的标记实验，能够显示在发育的同一时间点细胞增殖和凋亡的情况，可以更清楚地了解两者之间的关系(图版Ⅱ)。在中华蜜蜂变态发育过程中，蕈形体内的细胞凋亡大约集中在蛹发育期的第 3 – 6 天内，并且仅局限在增殖细胞群内部。第一个凋亡信号出现时(P3)，细胞增殖依然很活跃，在蛹发育的第 5 和第 6 天，蕈形体增殖细胞丛内近千个细胞的增殖活动突然全部停止。细胞增殖的终止和细胞开始凋亡在时间和空间上非常一致，即蕈形体增殖细胞丛内广泛的细胞凋亡开始的时间大约是在细胞增殖终止时。这支持了蕈形体成神经细胞是由增殖到凋亡的转换过程中被清除的假设(Ganeshina *et al.*，2000)。成虫 Kenyon 细胞的最终数量可能就是通过对细胞增殖终止时间以及 Kenyon 细胞产生速度的调节决定的。

3.3 中华蜜蜂蕈形体、视叶和嗅叶胚后发育的关系

通过对中华蜜蜂中枢神经系统的蕈形体、视叶和嗅叶胚后发育过程的研究表明，中华蜜蜂各部分结构发育的高峰期一般集中在幼虫发育结束到蛹发育开始。在整个发育过程中，蕈形体发育持续的时间较长，从孵化开始一直持续到蛹发育中期(P5 – P6)结束；其次是嗅叶(李兆英和奚耕思，2008)，大约结束在 P5；发育持续时间最短的是视叶(李兆英和奚耕思，2010)，其细胞增殖大约结束在 P2 – P3 期。

蕈形体主要接收来自脑部区域的视觉和嗅觉的感觉输入，这些冲动传入到冠区，随后通过 Kenyon 细胞发出的轴突传入柄及柄基部的 α 叶和 β 叶。较快发育的视叶刺激了蕈体冠的基环和领的形成，而基环和领也正是由较早出现的蕈形体外部致密细胞发出的树突所形成；随后出现的非致密细胞发出的树突形成了蕈体冠的领和唇，接收来自于视叶和嗅叶的神经投射；非致密细胞发出的树突形成蕈形体的最后一部分结构——唇，接受较晚发育完成的嗅叶的神经投射；而最后出现的内部致密细胞发出的树突补充到基环部位。视觉和嗅觉神经元感觉神经纤维的进入对视叶内的视神经节层和嗅叶的发育以及神经细胞的分化起着至关重要的作用，表明神经系统的发育往往与投射神经的刺激紧密相关。

广泛的细胞凋亡是中华蜜蜂脑部胚后发育过程中的一个显著特征。其中蕈形体中细胞凋亡持续的时间最短，大约集中在蛹期第 3 – 6 天中，而且凋亡细胞数量较少，主要是对完成使命神经细胞的清除；在嗅叶的发育过程中细胞凋亡也非常少见，只在幼虫发育末期(L4)到蛹发育早期(P3)有个别的中间神经元凋亡，增殖细胞和凋亡细胞数量的相对

比率基本恒定；而视叶内的细胞凋亡持续时间最长，大约从幼虫早期开始一直持续到蛹期的第 4 天左右，凋亡细胞的数量也一直维持在一个较高的水平。在这里凋亡主要是为了淘汰过剩的神经细胞，以建立适当规模和结构的神经网络。在中华蜜蜂脑部各结构胚后发育的过程中，细胞凋亡频繁的区域往往同增殖活跃的部位完全吻合，细胞凋亡的数量和位置则同各部分结构的发育时间以及神经投射有着密切的相关性，即投射关系越明确，其形成的突触联系越准确，发生凋亡的细胞就越少。

参 考 文 献 (References)

Abercrombie M, 1946. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat. Rec.*, 94: 239 – 247.

Booker R, Truman JW, 1987. Postembryonic neurogenesis in the CNS of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. II. Hormonal control of imaginal nest cell degeneration and differentiation during metamorphosis. *J. Neurosci.*, 7: 4107 – 4114.

Cai WQ, Li HB, 1999. Developmental Neurobiology. Science Press, Beijing. 222 – 238. [蔡文琴, 李海标, 1999. 发育神经生物学. 北京: 科学出版社. 222 – 238]

Cayre M, Strambi C, Charpin P, Augier R, Meyer MR, Edwards JS, Strambi A, 1996. Neurogenesis in adult insect mushroom bodies. *J. Comp. Neurol.*, 371: 300 – 310.

Ceron J, Tejedor FJ, Moya F, 2006. A primary cell culture of *Drosophila* postembryonic larval neuroblasts to study cell cycle and asymmetric division. *European Journal of Cell Biology*, 85: 567 – 575.

Dyar HG, 1890. The number of molts of lepidopterous larvae. *Psyche*, 5: 420 – 422.

Edwards JS, 1969. Postembryonic development and regeneration of the insect nervous system. *Adv. Insect Physiol.*, 6: 97 – 137.

Fahrbach SE, Moore D, Capaldi EA, Farris SM, Robinson GE, 1998. Experience-expectant plasticity in the mushroom bodies of the honeybee. *Learn. Mem.*, 5: 115 – 123.

Ganeshina O, Schäer S, Malun D, 2000. Proliferation and programmed cell death of neuronal precursors in the mushroom bodies of the honeybee. *J. Comp. Neurol.*, 417: 349 – 365.

Gronenberg W, Heeren S, Hölldobler B, 1996. Age-dependent and task-related morphological changes in the brain and the mushroom bodies of the ant *Camponotus floridanus*. *J. Exp. Biol.*, 199: 2011 – 2019.

Hammer M, Menzel R, 1995. Learning and memory in the honeybee. *J. Neurosci.*, 15: 1617 – 1630.

Heisenberg M, 1998. What do the mushroom bodies do for the insect brain? An introduction. *Learn. Mem.*, 18(5): 1 – 10.

Li ZY, 2010. Programmed cell death of developing optic lobes in the honeybee, *Apis cerana cerana*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 47(4): 680 – 684. [李兆英, 2010. 中华蜜蜂工蜂视叶胚后发育过程中的细胞凋亡. 昆虫知识, 47(4): 680 – 684]

Li ZY, Xi GS, 2008. Postembryonic development of olfactory lobe in the worker bees of *Apis cerana cerana*. *Acta Zoologica Sinica*, 54(3): 546 – 554. [李兆英, 奚耕思, 2008. 中华蜜蜂工蜂嗅叶的胚后发育. 动物学报, 54(3): 546 – 554]

Li ZY, Xi GS, 2010. Postembryonic development of the optic lobes in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Sinica*, 53(2): 160 – 166. [李兆英, 奚耕思, 2010. 中华蜜蜂工蜂视叶的胚后发育. 昆虫学报, 53(2): 160 – 166]

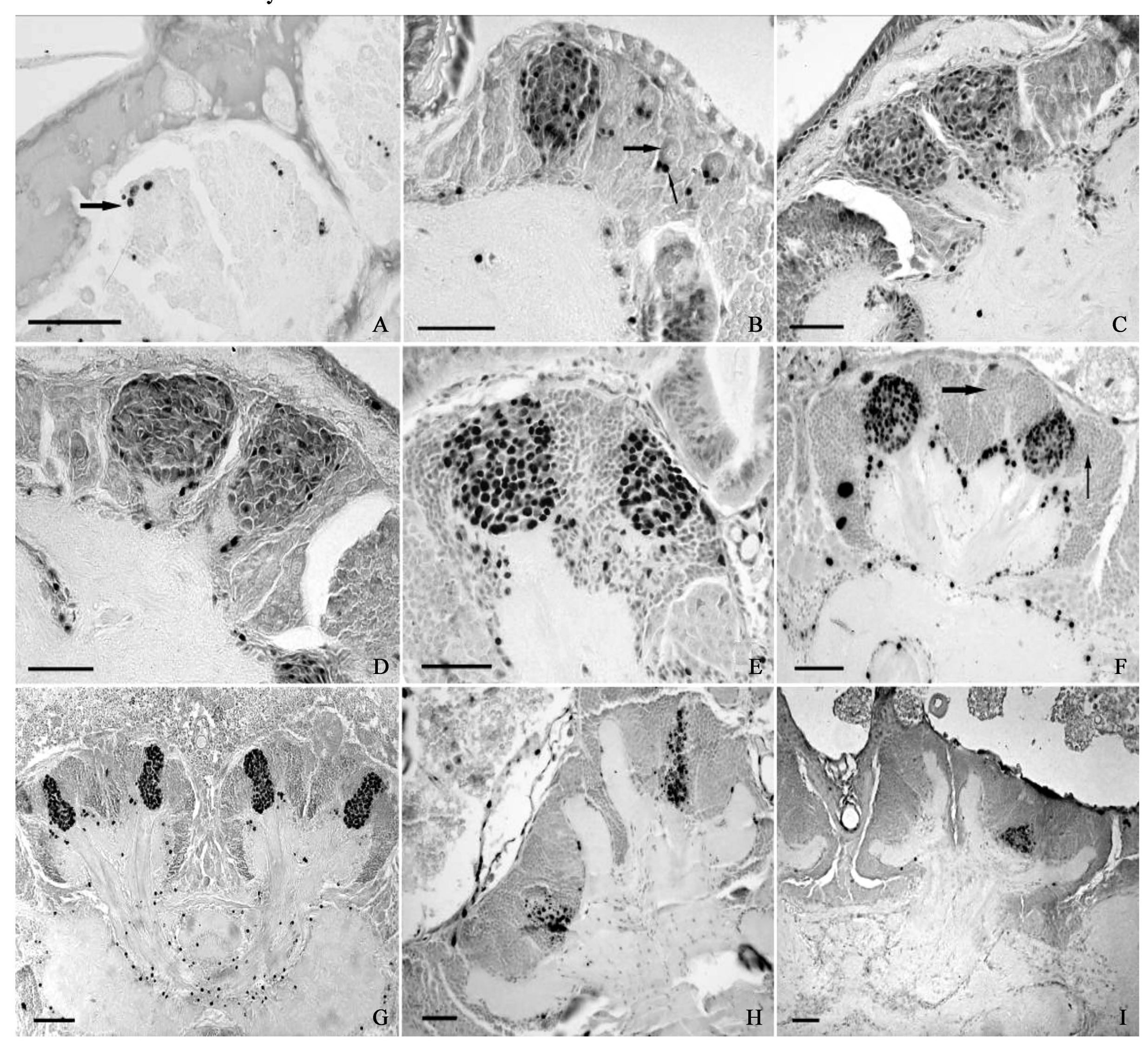
Nordlander RH, Edwards JS, 1969. Postembryonic brain development in the monarch butterfly, *Danaus plexippus* plexippus L. I. Cellular events during brain morphogenesis. *Whilhelm Roux's Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen (Berlin)*, 162: 197 – 217.

Winberg ML, Perez SE, Steller H, 1992. Generation and early differentiation of glial cells in the first optic ganglion of *Drosophila melanogaster*. *Development*, 115: 903 – 911.

(责任编辑：赵利辉)

李兆英等：基于免疫组织化学方法的中华蜜蜂蕈形体胚后发育过程中细胞增殖和凋亡的观察　　　　图版Ⅰ

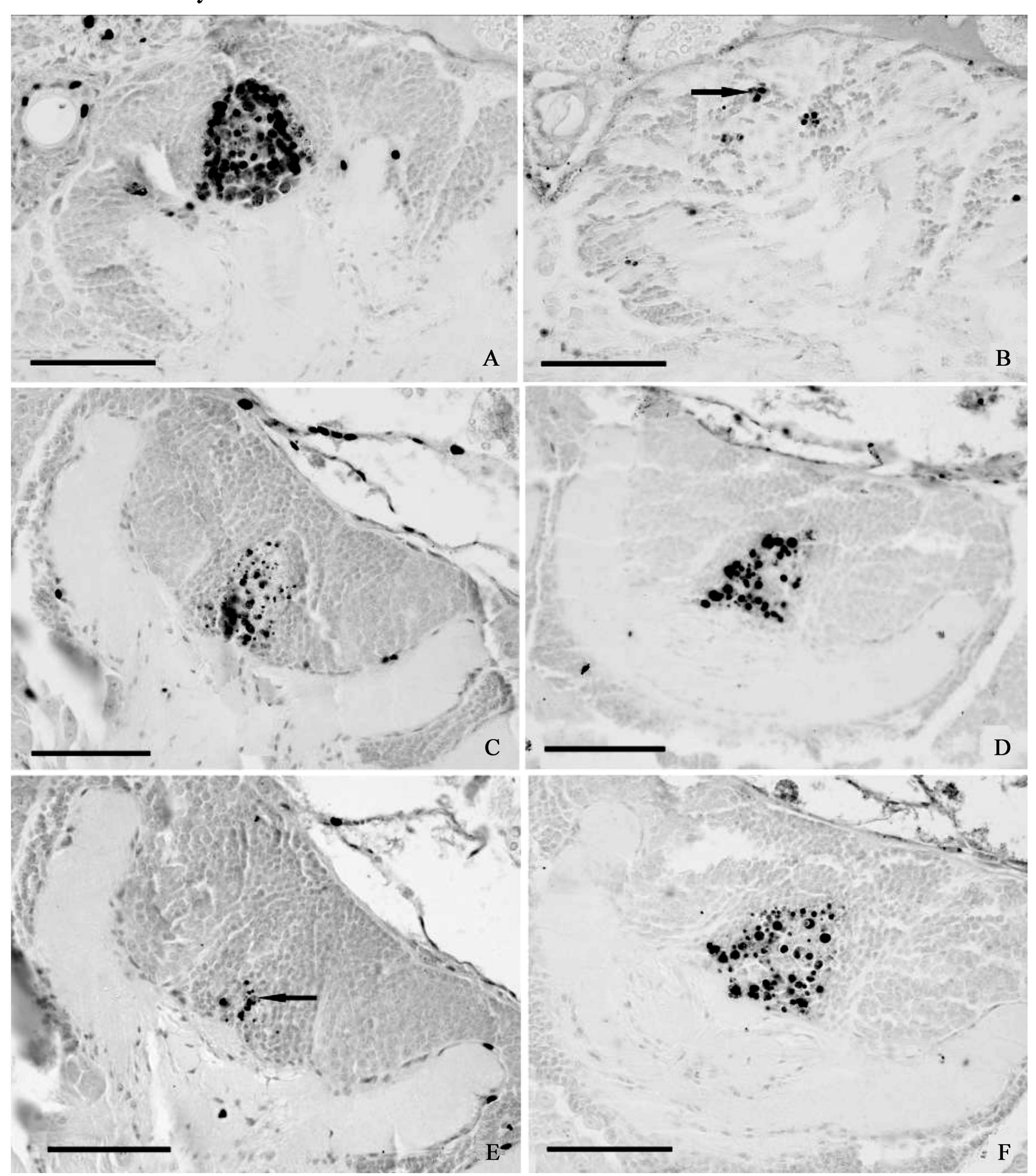
LI Zhao-Ying *et al*.: Observation of neurogenesis and programmed cell death in the mushroom bodies of the honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) using immunohistochemistry method　　　　Plate Ⅰ



A: L1 前脑背侧区域，箭头指示为单个的成神经细胞 Dorsal protocerebrum regions of the 1st instar larva. Arrows indicate solitary neuroblasts. B: L2 右前脑内的增殖细胞丛（中），粗箭头指示为大型的成神经细胞，细箭头指示为神经节母细胞 MB neuroblast clusters (medial) in the right protocerebrum of the 2nd instar larva. Thick arrow: neuroblasts; Thin arrows: ganglion mother cell. C: L3 左前脑内的中增殖细胞丛（右）和侧增殖细胞丛（左） Medial (right) and lateral (left) neuroblast cluster in the left protocerebrum of the 3rd instar larva. D: L4 左前脑内的增殖细胞丛（中间和侧面）Neuroblast cluster (medial and lateral) in the right protocerebrum of the 4th instar larva. E: L5 左前脑内的增殖细胞丛（中间和侧面）Neuroblast clusters of the 5th instar larva. F: P1 前脑内的增殖细胞丛，粗箭头指示为外部的致密细胞，细箭头指示为内部的非致密细胞 Neuroblast clusters in the protocerebrum of the day 1 pupa. Thick arrow: outer compact cells; Thin arrows: inner noncompact cells. G: P2 前脑内的增殖细胞丛 MB neuroblast clusters in the protocerebrum of the day 2 pupa. H: P4 前脑内的增殖细胞丛 MB neuroblast clusters in the protocerebrum of the day 4 pupa. I: P5 前脑内的增殖细胞丛 MB neuroblast clusters in the protocerebrum of the day 5 pupa. 标尺 Scale bars = 100 μm.

李兆英等：基于免疫组织化学方法的中华蜜蜂蕈形体胚后发育过程中细胞增殖和凋亡的观察 图版Ⅱ

LI Zhao-Ying *et al*.: Observation of neurogenesis and programmed cell death in the mushroom bodies of the honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) using immunohistochemistry method Plate Ⅱ



A,C,E: BrdU 标记 8 h 后细胞增殖状况，箭头指示为蕈体冠内的增殖细胞 Cell proliferation at 8 h after BrdU incorporation. The arrow indicates the proliferating cells in the calyx. B,D,F: TUNEL 标记的凋亡细胞，箭头指示为蕈体冠内的凋亡细胞 Apoptotic cells labeled with the TUNEL method. The arrow indicates the apoptotic cells. A,B: P3; C,D: P5; E,F: P6. 标尺 Scale bars = 100 μm.